

特表平6-500802

第3部門第2区分

(43) 公表日 平成6年(1994)1月27日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 9/70	3 5 8	7038-4C	
37/24	A D S	8314-4C	
47/42	C	7433-4C	
A 6 1 L 15/44		7108-4C	
			A 6 1 L 15/ 03
			審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 15 頁)

(21) 出願番号 特願平5-501020
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)6月11日
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)2月12日
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 2 / 0 4 9 2 9
 (87) 国際公開番号 W O 9 2 / 2 2 3 0 4
 (87) 国際公開日 平成4年(1992)12月23日
 (31) 優先権主張番号 7 1 5 , 1 6 5
 (32) 優先日 1991年6月14日
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (31) 優先権主張番号 7 1 6 , 8 6 2
 (32) 優先日 1991年6月18日
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (81) 指定国 A U , C A , J P

(71) 出願人 アムジエン・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・91320
 -1789、サウザンド・オークス、デハビル
 ランド・ドライブ・1840
 (72) 発明者 ソング、スカーズ
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・93021、
 ムーアパーク、アルダーブルック・ストリ
 ート・12070
 (72) 発明者 モラウイツキ、アンドリユー
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・93010、
 カマリロ、ウオーカー・アベニュー・684
 (74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コラーゲンフィルムによるタンパクのドラッグ・デリバリー

(57) 【要約】

本発明は医薬品の放出供給維持性を改善するために有用な単層及び多層コラーゲンフィルムに関するものである。

1. 第一速度制御層及び少なくとも一つ以上の医薬貯蔵層からなるコラーゲンフィルムであって、各層が互いに接触して積層体を形成し、該積層体の片側末端に速度制御層が位置し、かつ速度制御層が他層の内の一層のみと接触し、該他層が医薬貯蔵層であるコラーゲンフィルム。
2. 速度制御層がコラーゲン及び活性成分からなる請求項1記載のコラーゲンフィルム。
3. 速度制御層にいかなる活性成分をも含まない請求項2記載のコラーゲンフィルム。
4. 各医薬貯蔵層がコラーゲン及び活性成分からなる請求項3記載のコラーゲンフィルム。
5. 医薬貯蔵層の数が1～5である請求項4記載のコラーゲンフィルム。
6. 医薬貯蔵層の数が1～3である請求項5記載のコラーゲンフィルム。
7. 医薬貯蔵層の数が3である請求項6記載のコラーゲンフィルム。

コラーゲンフィルム。

8. 医薬貯蔵層がさらに緩衝剤をも含んでなる請求項11記載のコラーゲンフィルム。
9. 活性成分がPDGF、EGF、FGF、PDEGF、PD-ECGF、KGF、IGF-1、IGF-2、TNF、BDNF、CNTF、及びNT-3からなる群より選ばれる請求項11記載のコラーゲンフィルム。
10. 活性成分がPDGFである請求項11記載のコラーゲンフィルム。
11. 請求項1記載のコラーゲンフィルムを介して、創傷治癒に有効な量の活性成分を投与する上皮創傷治癒促進方法。
12. 第二速度制御層を、積層体において第一速度制御層の位置する末端と逆側の末端に、含んでなる請求項1記載のコラーゲンフィルム。
13. 各速度制御層がコラーゲン及び活性成分からなる請求項11記載のコラーゲンフィルム。
14. 速度制御層がいかなる活性成分をも含まない請求項11記載のコラーゲンフィルム。
15. 医薬貯蔵層がコラーゲン及び活性成分からなる請求項11記載

8. 速度制御層及び各医薬貯蔵層の肉厚が、それぞれ独立して約0.11mm～約1mmである請求項7記載のコラーゲンフィルム。
9. 速度制御層及び各医薬貯蔵層の肉厚が、それぞれ独立して約0.15～約0.5mmである請求項8記載のコラーゲンフィルム。
10. 速度制御層及び各医薬貯蔵層の肉厚が、それぞれ独立して約0.11～約0.1mmである請求項9記載のコラーゲンフィルム。
11. 速度制御層がさらに可塑剤をも含んでなる請求項10記載のコラーゲンフィルム。
12. 医薬貯蔵層がさらに可塑剤をも含んでなる請求項11記載のコラーゲンフィルム。
13. 速度制御層がさらに安定剤をも含んでなる請求項12記載のコラーゲンフィルム。
14. 医薬貯蔵層がさらに安定剤をも含んでなる請求項13記載のコラーゲンフィルム。
15. 速度制御層がさらに乾燥促進剤をも含んでなる請求項14記載のコラーゲンフィルム。
16. 医薬貯蔵層がさらに乾燥促進剤をも含んでなる請求項15記載のコラーゲンフィルム。
17. 速度制御層がさらに緩衝剤をも含んでなる請求項16記載の

コラーゲンフィルム。

16. 医薬貯蔵層の数が1～5である請求項15記載のコラーゲンフィルム。
17. 医薬貯蔵層の数が1～3である請求項16記載のコラーゲンフィルム。
18. 医薬貯蔵層の数が、3である請求項17記載のコラーゲンフィルム。
19. 各速度制御層及び各医薬貯蔵層の肉厚が、それぞれ独立して約0.01～約1mmである請求項18記載のコラーゲンフィルム。
20. 各速度制御層及び各医薬貯蔵層の肉厚が、それぞれ独立して約0.05～約0.5mmである請求項19記載のコラーゲンフィルム。
21. 各速度制御層及び各医薬貯蔵層の肉厚が、それぞれ独立して約0.01～約0.1mmである請求項20記載のコラーゲンフィルム。
22. 速度制御層がさらに、可塑剤をも含んでなる請求項21記載のコラーゲンフィルム。
23. 医薬貯蔵層がさらに可塑剤をも含んでなる請求項21記載のコラーゲンフィルム。
24. 速度制御層がさらに安定剤をも含んでなる請求項21記載のコラーゲンフィルム。

15. 医薬貯蔵層がさらに安定剤をも含んでなる請求項14記載のコラーゲンフィルム。
16. 速度制御層がさらに乾燥促進剤をも含んでなる請求項14記載のコラーゲンフィルム。
17. 医薬貯蔵層がさらに乾燥促進剤をも含んでなる請求項15記載のコラーゲンフィルム。
18. 速度制御層がさらに緩衝剤をも含んでなる請求項16記載のコラーゲンフィルム。
19. 医薬貯蔵層がさらに緩衝剤をも含んでなる請求項17記載のコラーゲンフィルム。
40. 活性成分がPDGF、EGF、FGF、PDEGF、PD-ECGF、KGF、IGF-1、IGF-2、及びTNFからなる群より選ばれた請求項11記載コラーゲンフィルム。
41. 活性成分がPDGFである請求項11記載のコラーゲンフィルム。
42. 請求項11記載のコラーゲンフィルムを介して創傷治癒に有効量の活性成分を投与する内部創傷治癒の促進方法。
43. 少なくとも一つ以上の医薬貯蔵層からなり、該医薬貯蔵層が互いに接触し、積層体を形成してなるコラーゲンフィルム。

明 細 書

コラーゲンフィルムによるタンパクのドラッグ・デリバリー

発明の背景

本発明は、1991年6月14日の“コラーゲンフィルムによるタンパクのドラッグ・デリバリー”米国特許出願番号07/115,165からの一部継続出願である。本発明は単層及び多層のコラーゲンフィルムからなり、医薬の放出維持性に改良を加えた、優れた性質を持つものに関連する。

コラーゲンを含む多層の膜が先行技術に於いて使用されている。Abbenkert他が(Surg. Forum 15: 477-478, 1985) 2~3mm厚のコラーゲンフィルムをウシ皮より抽出したコラーゲンを加熱脱水することによって得たものを発表している。また、Chenは非化学的架橋コラーゲンを任随生成することによって得た医薬放出性維持に優れたコラーゲン移植を開示している[1986年7月9日公開の欧州特許出願187016、1986年7月15日発行の米国特許4,800,533、米国特許4,855,988 1987年4月7日発行、米国特許4,889,399 1987年4月25日発行、PCT特許出願WO 90/00068 1989年8月21日公開]。Cioca [米国特許4,412,947 1983年11月1日発行]は本質的に純粋なコラー

44. 請求項11記載のコラーゲンフィルムを介して創傷治癒に有効量の活性成分を投与する上皮創傷治癒の促進方法。
45. 請求項11記載のコラーゲンフィルムを介して創傷治癒に有効量の活性成分を投与する内部創傷治癒の促進方法。

ゲンシートを有機酸へのコラーゲン分散液の凍結乾燥により作成し、開示した。Kuroyagaki他[欧州特許出願167,828 1984年1月15日公開、米国特許4,642,119 1987年2月10日発行]はコラーゲン及びポリα-アミノ酸の2層から構成される人工皮膚を開示した。Berg他[米国特許出願4,441,962 1983年6月27日発行]は接着層、架橋コラーゲン基質、多層高分子フィルムの3層から構成される創傷被覆材を開示した。Solomon (米国特許4,150,699 1980年8月21日発行)はアクリル系粘着剤に10%未満のコラーゲンを含有させてなる創傷被覆材を開示した。

Cioca他(英国特許1,347,582)はコラーゲン基質の高分子分散液の凍結乾燥により得られるコラーゲン創傷被覆材を開示した。Stellingsma他(欧州特許069260 1983年1月12日公開)は天然の純度の高いコラーゲンからなるコラーゲン差込み物を開示した。Zimmerman他(米国特許4,453,939 1984年6月12日発行)はフィブリノーゲン、第8凝固因子、及び/またはトロロンピンをコーティングしたコラーゲンを含む創傷治療組成材を開示した。

Leibovich他(米国特許4,888,482 1989年2月発行)はコラーゲン、生分解性高分子、腫瘍壊死因子を含んでなる創傷治

原組成を開示した。[1]及びBerke [1], Blood, Mat. Res., 14: 68-81(1979)]はコラーゲンを含有する数例より、人工皮膚の概念を述べている。Chvapil他のInt. Rev. Connect. Tissue Res., 6: 1-61(1979)、特に51-52ページ及びPachence他のMed. Device and Diag. Tech., 1: 49-55(1987)の様々なコラーゲンの利用法の報告の中に医療放出媒体としての利用があった。

さらに、付け加えるならば、コラーゲンは医療含有スポンジの構成として利用されている[Artafi、米国特許3,157,514 1964年11月17日発行やBerg他米国特許4,320,201 1982年3月16日発行やDallan他Scanning Electron Microscopy 11: 1313-1320(1984)やDallan及びSilverのBiomaterials 1: 3-1(1986)やDallan他のBiomaterials 2: 195-200(1987)やOliveranni他のJ. Trauma 16: 348-353(1976)やCollins他のSurg. Forum 27: 511-533(1976)]報告がある。またコラーゲンを医療含有の軟膏の構成として利用する[PCT特許出願WO 86/03122 1986年6月5日公開]報告もある。

コラーゲンはまた感電創傷の治療にも利用されている(米国特許4,937,323 1990年6月26日発行)。

医療貯蔵層からなるコラーゲンフィルムであり、ここで言う層とは互いに接触しており複層形態をなす医療貯蔵層である。

好ましくは、速度制御及び/または医療貯蔵層には、さらに可塑剤及び/または安定剤及び/または乾燥促進剤及び/または緩衝剤を含む。活性成分は好ましくは次に列挙する群より選ばれる。PDGF, EGF, FGF, PDEGF, PD-ECGF, KGF, IGF-1, IGF-2, TNF, BDNF, CNTF, NT-3。

より好ましくは、活性成分はPDGFかPD-ECGFのいずれかが選ばれる。

本発明のもう一つの主題としては、第二の速度制御層をさらに有するコラーゲンフィルムであり、ここで言う第二速度制御層とは第一速度制御層のある側と反対側の複層末端に位置するものである。

本発明のもう一つの主題としては、本発明のコラーゲンフィルムを介して創傷治療に有効量の活性成分を投与し上皮創傷の治療を促進する方法である。

本発明のもう一つの主題としては、複層体の向い合った両末端に二つの速度制御層を有するコラーゲンフィルムを介して創

傷の治療に効果的な量の活性成分を投与することによって内部の創傷の治療を促進する方法である。

発明の要約

本発明は、まず速度制御層及び1層またはそれ以上の医療貯蔵層とからなるコラーゲンフィルムに関するものであり、ここで言う層とは互いに接触し、複層形態を形成し、速度制御層は複層物の片側の末端に存在する。

この条件においては速度制御層は片面のみ他層と接触しており、その他層が医療貯蔵層となる。速度制御層には活性成分を含まないことが好ましく、より好ましくは1-5層の医療貯蔵層を有する。

好ましくは、医療貯蔵層及び/または速度制御層の肉厚は約0.01-約1mmであり、より好ましくは約0.05-約0.5mmの肉厚を有し、最も好ましくは約0.01-約0.02mmの肉厚を有する。

本発明のもう一つの主題としては、1層またはそれ以上の医

図の説明

図1は例1Bに記述した通り不溶性コラーゲン繊維より作成した単層コラーゲンフィルム(肉厚0.1mm)からのPDGFの放出速度挙動を示している。

図2は例1Bに記述した通り不溶性コラーゲン繊維より作成した単層コラーゲンフィルム(肉厚0.3mm)からのPDGFの放出速度挙動を示している。

図3は例1Bに記述した通り不溶性コラーゲン繊維より作成した単層コラーゲンフィルム(肉厚0.1mm)からのPDGFの放出速度挙動を示している。

図4は例2に記述した通り可溶性コラーゲンより作成した二層複層コラーゲンフィルム(肉厚0.01-1.0mm)からのPDGFの放出速度挙動を示している。

図5は例3に記述した通り可溶性コラーゲンより作成した四層複層コラーゲンフィルム(肉厚0.01-1.0mm)からのPDGFの放出速度挙動を示している。

図6は例1Aに記述した通り、可溶性コラーゲンより作成し

た厚層コラーゲンフィルム（肉厚0.01-1.0mm）からの多量の活性成分の放出速度挙動を示している。

図7はCotter Transwell Cell 試料中のタンパク濃度の測定値であり、次の異なる3つの方法で測定した。

ELISA法（黒塗り印）、 125 IラベルPDGF（白四角印）、 3 H-トリミジン取り込み分析法（黒四角印）。

図8は創傷の治癒進行端部における肉芽組織の最大値（明線線では単位はmm）及び新生肉芽組織のおおよその面積と体積の計算測定値である（暗線線では単位はmm³）。ただし、これらは創傷が同心円的に治癒が進み収縮しないと仮定して行なった。

図9は動物の腎部位に付けた線形状創傷の引き裂強度においてPDGFの影響を無治療の動物と比較した結果である。

発明の詳細な説明

本発明は一つまたは、二つの速度制御層と一つまたはそれ以上の医薬貯蔵層とからなるコラーゲンフィルムに関するものであり、ここで言う層とは積層状態となり互いに接触している。

ここで速度制御層は積層体の片面または両側の末端に存在し、その片面の面のみが他層と接触しているものを言い、その他の層を医薬貯蔵層と言う。好ましくは、積層体の片末端に、唯一

速度制御層はコラーゲン繊維を懸濁させた分散液からも生成することができる。

市販されているコラーゲン繊維（Vitaphore Co., Menlo Park, California）は適当な溶媒例えば水に分散させることができ、コラーゲン重量で約0.1〜約10%のコラーゲン懸濁液を生成できる。好ましい濃度としてはコラーゲン重量で約1〜約2%である。コラーゲン繊維の懸濁液中での分散を助長するためには、適当な希酸を溶媒中に存在させることができる。特に適当な酸は約5%濃度の酢酸である。

可溶性コラーゲン溶液または、コラーゲン繊維が懸濁した分散液は溶媒キャスト法を用いてフィルムにできる。

典型としては、コラーゲン溶液を型の中に流し込み、乾燥させるわけである。型としては、乾燥させたコラーゲンフィルムが型表面に粘着してしまわない様に非粘着性の性質を有していることが好ましい。特別に適当な型表面は、テフロンTMである。適当な条件としては、流延した溶液が乾燥するのに適当な温度、適当な時間が含まれる。一般的に、乾燥温度を上げた場合、乾燥時間は短くする必要がある。

とりわけ、適性温度とは約15℃〜35℃であり、好ましくは室

の適性制御層を持ったものが良い。

速度制御層は可溶性コラーゲンの溶液から生成することができる。

溶性コラーゲンは平均分子量が100,000未満のコラーゲンであり、好ましくは約100,000の分子量を持つものである。

特に適合する可溶性コラーゲンはSandoz S (Sandoz Medical Co., Malvern, Pennsylvania) である。この特別な可溶性コラーゲンはさらに次の利点がある。

この可溶性コラーゲンはアテロペプチド型コラーゲンであり、精製コラーゲンの末端部に位置し抗原性に大きく関係するテロペプチドを除去したコラーゲンである。テロペプチド型コラーゲン溶液は有機酸を用いて加水分解することでアテロペプチド型コラーゲン溶液とすることができる。可溶性コラーゲンのもう一つの好ましい性質としては、架橋度が極めて低いことが上げられる。例えばそれは、0.5%またはそれ未満である。

可溶性コラーゲンは適当な溶媒例えば水に溶解することができ、コラーゲン重量で約0.5〜約10%の溶液を調製できる。好ましい濃度としてはコラーゲン重量で約1〜約5%であり、より好ましくは、重量で約2%である。

温である。また適性乾燥時間とは、周辺部における溶媒含量の損失量が本質的にゼロとなるのに十分な時間である。（例えば、乾燥時間は約1時間〜約10日、好ましくは約1日〜約5日である。）

活性成分の放出速度に作用する最も大切な因子としてフィルムの肉厚がある。また可溶性の速度制御層中の存在の有無/存在量も同様である。なぜならば、それらは乾燥フィルムの肉厚を適当なものとするのに重大であるからである。それら速度制御層の特に適当な肉厚は約0.01〜約1mm、好ましくは約0.05〜約0.5mm、最もこのしくは約0.1〜約0.2mmである。

本願のコラーゲンフィルムに要求される特性を最大限に発揮するために各種添加物を選び、コラーゲン溶液、フィルムに含有させても良い。それら要求される特性とは、柔軟性、安定性、乾燥促進性、そして活性成分と適合するpHが含まれる。柔軟性を改善するためには適当な可塑性を使用できる。適当な可塑性とはポリエチレングリコール及びグリセリンであり、好ましくはグリセリンである。これら可塑性はコラーゲン存在量の重量に対して0〜約100%相当量まで添加可能であり、好ましくはコラーゲン重量に対して約10〜約30%、最も好ましくはコラ

ーゲン重量に対して約1%相当量添加する。

活性成分の安定性を改善するために、適当な安定剤がフィルム中に使用可能である。適当な安定剤としては糖類、好ましくはマンニトール、ラクトース、グルコースであり、より好ましくはマンニトールである。これら安定剤はコラーゲン重量に対して0~約5%添加可能であり、好ましくは、コラーゲン重量に対して約1%の添加である。

フィルムの乾燥を促進するために、乾燥促進剤が使用できる。適当な乾燥促進剤としては、アルコールが含まれ、好ましくは、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコールであり、より好ましくはエタノールである。これら乾燥促進剤は溶液または堅固体の総重量に対して0~約50%相当量が添加可能であり、好ましくは溶液または堅固体の総重量に対して約10~約30%相当量、より好ましくは、溶液または堅固体の総重量に対して約10%相当量を添加する。

使用する特定の活性成分に適切なpHを得るために、適当な緩衝剤がフィルム中に使用可能である。適当な緩衝剤とは、一般に知られ利用されている生物学的緩衝剤のほとんどが含まれ、好ましくは酢酸塩、リン酸塩、クエン酸塩、より好ましくは酢

酸塩及びリン酸塩である。これら緩衝剤はコラーゲン重量に対して約0.01~約2%相当量が添加可能である。適当なpHとは活性成分の安定性を維持し、それらの治療効果を最大とし、それらの分解を促進するpH値をとる。適当なpHは一般には約3~約8で、好ましくは約5~約8、最も好ましくは、pH約7.0~7.5の中性である。

通常、活性成分は速度制御層に存在しないが、本発明では意図的に次の様な具体例を試みた。その結果活性成分の速度制御層への処方が開発できた。

しかしながら、速度制御層中に存在できる濃度としては、いかなる活性成分においても、医薬貯蔵層中の活性成分濃度よりも低いことが好ましい。

医薬貯蔵層は速度制御層と同じ手法で作成する。活性成分を含む速度制御層であれば活性成分を追加する手法で、活性成分を含まない速度制御層であれば活性成分を存在させて作成するわけである。好ましい活性成分としては、次の様な生物学的薬剤がある。創傷治癒促進剤または神経組織再生促進剤、特に組み換えタンパク質である。それら好ましい活性成分とは、血小板由来増殖因子(PDGF)、上皮細胞成長因子(EGF)、

繊維芽細胞成長因子(FGF)、血小板由来上皮細胞因子(PDEGF)、血小板由来血管内皮細胞成長因子(PDECGF)、ケラチン細胞成長因子(KGF)、インシュリン様成長因子1及び同2(IGF-1及びIGF-2)、腫瘍壊死因子(TNF)、脳由来神経因子(BDNF)、毛様体向神経因子(CNTF)、ニューロトロフィン-3(NT-3)を含み、好ましい活性成分はPDGFまたはPDECGFであり、最も好ましくは、PDGFである。これら活性成分の存在量としては、例えば創傷治癒促進成分の場合、創傷治癒を促進するのに有効な量を存在させる。実際の活性成分の量は臨床医の処置で決定されるであろう。この際には様々な因子によって決定されるであろう、たとえば創傷の疼痛程度、患者のコンディション、患者の年齢、並びにいくつかの副損傷、患者の創傷と別に所有する医学上の病気などがある。一般的には、活性成分の総量としては約1 μ g/cm²~5 μ g/cm²の範囲であろう。

医薬貯蔵層の特に適当な肉厚は約0.01~約1mmであり、好ましくは約0.05~約0.5mm、最も好ましくは約0.1~約0.2mmである。

いくつかの方法を用いることで様々な層が互いに接触する。

それら方法の一つとしては、各層どうしが互に隣合う様に置き、外部より圧力を加え、層どうしを一体化させる方法がある。他の一方法としては各層を積層する前に互いの層表面を溶媒(たとえば水)と接触させることで互いの層表面をコートし、各層の薄い表面部でタンパク質を溶かし、その後接触させることで接着させる方法である。他の一方法としては、少なくとも一つの接触面に公知の接着剤を使用する方法である。その接着剤とは、層からの活性成分の放出を妨害しないことが好ましい。

各層を接触させて行く好ましい方法は均等な圧力を作用させ、各層どうしを接触する方法である。

医薬貯蔵層の数は要求される放出特性によって決定する。一般には、層数を増やすことによって活性成分の放出の安定性及び持続性を向上させることができる。好ましくは医薬貯蔵層数としては1~10、より好ましくは1~5、そして最も好ましくは1~3である。活性成分の濃度は各層間で異なることも可能であり、また各層間において肉厚も同一である必要はない。

速度制御層は積層体の片面または両側末端にあれば良い。片面側末端のみに速度制御層を有する積層体は、特に表皮への活性成分の供給に適している。両側末端に速度制御層を有する積層体

は特に、内部創傷または外科切開の様な二面向創傷への活性成分の供給に適している。複層体の片側末端にのみ速度制御層を有する場合、もう一方の複層体末端層には、裏材層を選択して設けても良い。これら裏材層としては慣例に知られるものであれば何でも良い。一般的には、裏材層はポリウレタン製である。

本発明のコラーゲンフィルムは、その接触した細胞または組織に活性成分を選択的に供給する手段として有用なものである。例えば、火傷または他の皮膚外傷の治療において、速度制御層を一つ、裏材層を一つ有するコラーゲンフィルムを創傷部へ貼ることによって適当な活性成分を外傷を返った部分のみに選択的に供給できる。この様な利用において、PDGFは特に適当な活性成分である。複層体の両側末端に速度制御層を有するコラーゲンフィルムは外科的創傷の治療促進に使用できる。その様な用途に使用する際には外科切開部位にフィルムを入れ、二つの外科的創傷面が重なり合う間にフィルムがくる様に縫い合わせる。コラーゲンフィルムはまた向神経性因子の選択的供給にも利用できる。その様な利用法の場合、コラーゲンフィルムを神経組織と直接または、その隣近部に接触させることで向神経因子で処理することができる。

成長因子溶液（放射性物質を含む、または含まない）をコラーゲン溶液に加えた。テフロンTM表面に溶液を流延し、室温下においてフィルムの重量が一定となるまで（約1～3日間）乾燥した。こうして様々な成長因子濃度をもったコラーゲンフィルムを得た。表1に異なる濃度のコラーゲン溶液より調製したフィルムの肉厚を示す。

図6にコラーゲンフィルムからのPDGFの放出挙動として例4の方法により得た様々な単層フィルムからの放出挙動を示した。

表 1

コラーゲンフィルムの肉厚

A. 4%コラーゲン溶液

容器の直径	コラーゲン溶液量	フィルムの肉厚
3.5cm	1.5ml	1.8mil
	1.5ml	1.8mil
5.0cm	3.2ml	1.8mil
	1.6ml	1.8mil
	1.6ml	1.8mil

例

次に列挙する例は特別な具体例を示す意図で例示するものであり、本発明はこの範囲に限定されるものではない。

例1：単層コラーゲンフィルム試料

A. 可溶性コラーゲン

可溶性コラーゲン溶液の溶媒キャスト法により様々な成長因子を含有するコラーゲンフィルムを調製した。可溶性コラーゲンは、Sawyer社 (Prater, Pennsylvania) より購入した。

このコラーゲンはウシ由来であり、91%のI型コラーゲンと1%のIII型コラーゲンとから成っている。コラーゲンの分子量は100Kダルトンであり、密度は0.844g/ccである。コラーゲンよりテロペプチドが除去されているためコラーゲンの抗原性は最小限となっている。

まず、可溶性コラーゲンを0～5%の酢酸溶液に11～10℃下において溶解し約1～8%のコラーゲン溶液を調製した。可塑剤グリセリン（コラーゲン乾燥重量に対して約10%相当量）を添加後、溶媒の蒸発を促進するためにエタノールを添加した。アルコール量は溶液の総重量の約21%である。ここで、非溶解物質を除去するため、溶液を遠心した。

B. 8%コラーゲン溶液

容器の直径	コラーゲン溶液量	フィルムの肉厚
5.0cm	2.25ml	2.5mil
	2.25ml	2.8mil
	1.25ml	2.7mil

B. コラーゲン繊維懸濁液

不溶性コラーゲン繊維よりウェハを作成しPDGFの放出速度を測定した。2gの不溶性コラーゲン繊維 (Vitaphase Co., Menlo Park, California) を約110mlの0.2Mグリセリンを含有する5%酢酸溶液に分散させた。その溶液に、115IでラベルしたPDGFを痕跡量含有するPDGF溶液(112μl/ml)を約10ml加えた。5mlのアルコールを溶媒蒸発を促進するために加えた。三種類の異なる肉厚フィルムを得るため、混合液を三つ流延した。それぞれのフィルムを切開し数個のウェハを得た。フィルムの平均肉厚は、0.10、0.35、0.48mmであり、それぞれフィルム-A、フィルム-B、フィルム-Cとした。各ウェハからのPDGFの放出速度はFraser 散乱セル (Crown Glass Co., Somerville, New Jersey) を用いて測定した（絆創膏からの経路放出速度を決定する時に一般的に用い

られる測定法)。1. 拡散セルを使用することで、理論的に完全な降下状況が得られた。一枚のBerspore膜(Millipore Co., Bedford, Massachusetts) (ポアサイズ5 μ m) を用いて受液よりコラーゲンウェハを分離した。

図1にフィルム-A (肉厚0.1mm) より切削したウェハからのPDGF放出挙動を示した。11時間内にほとんどのPDGFが放出されていた。図2にフィルム-B (肉厚0.3mm) より切削したウェハからのPDGF放出挙動を示した。11時間の内に約11%のPDGFが放出されていた。

図3にフィルム-C (肉厚0.4mm) より切削したウェハからのPDGF放出挙動を示した。約11%のPDGFが放出された。図1, 2, 3に示したデータより、PDGF放出の持続性は1日~1週以上制御できる可能性が示唆される。

例2: 二層コラーゲンフィルム試料

二層コラーゲンフィルムは、創傷被覆材として生成、利用された。その創傷被覆材は長期間(12時間以上)創傷部位に対して成長因子をほぼ一定速度で選択的供給できるものであった。一例を上げると、一つ目のコラーゲン層(膜A)を可溶性コラーゲン(4%コラーゲンの10mM酢酸緩衝液(pH4)、0.85%

PDGFを含んでいる。

続く、放出性検討において、ほぼ一定した成長因子の放出が110時間以上維持された(図5)。その時、成長因子のおおよそ99%が放出されていた。

例4: 放出速度の測定

活性成分のコラーゲンフィルムからの放出速度はCoster Transwell Cells ('Cell') (Coster Co., Cambridge, Massachusetts) を次の様に使用することで導き出せる。コラーゲンフィルムは例1, 2, 及び3に記述した様に生成した。またウェハ(1.8cm直径)はフィルムを切削して生成した。各ウェハはCoster Transwell Cellに移し、ポリカーボネート製膜の上に乘せた。1.5mlの展開溶液(水及び1%ウシ血清アルブミン、または水及び0.15%ヒト血清アルブミン)をCellホルダー中に入れた。各Cellも溶液の中にセットして放出性検討を開始した。

特定の時間において、10%の展開溶液を分取しそれと同量の新鮮液を展開溶液に戻した。試料分取は10%の試料を得るごとに同じ手続を繰り返した。試料の放射能はガンマカウンター(Biochem Instruments, Co., Irvine, California)にて測定し

塩化ナトリウム溶液)、グリセリン(重量比でコラーゲンの10%量)、並びにエタノール(溶液の10%量)からなる水溶液による溶媒キャスト法により調製した。二つ目のフィルム(膜B)はPDGFをフィルム中に1149/μ含むことを除けば一つ目のフィルムとはほぼ同一の肉厚(0.11~3mm)でかつ同一の組成である。

この二つのフィルムを均等な圧力の作用によりお互いに付け一枚に結合させた。例4より得られるin vitroでの放出速度検討によれば成長因子の放出は11時間以上一定速度でなされていた(図4)。

例3: 多層複層コラーゲンフィルム試料

三層または四層フィルムは長時間、成長因子を放出する装置として調製された。一例として、四層フィルムを次の手法で調製した。例1Aの様に、四枚の異なるフィルムをキャスト法にて得、均等な圧力の作用のもとでそれぞれを付着させて一枚のフィルムに結合させた。それぞれの層の肉厚は近似していたが、異なる肉厚の厚を用いても良い。皮膚と接触することになる第一コラーゲン層にはPDGFは含まれていない。第二、第三、第四層にはそれぞれ0.01%, 0.15%, 0.10%の濃度で

た。展開溶液中のタンパク質濃度は随時放射能に基づいて計算し他方法、例えば、ELISA法及び3H-トリミジン取り込みバイオアッセイ法により確認した。この分析より得られる結果は例1, 2, 及び3の様々な複層と肉厚の結果に示した(図1~6)。図7は様々な方法でタンパク質濃度を測定した結果が測定法によらず一致していることを示している。

フィルムが標準的条件下において生成され、溶媒が同一条件下において完全に蒸発した場合、拡散係数はフィルムの肉厚に依存しないはずである。一般に、単層コラーゲンフィルムからのPDGFの放出挙動は、次の式で説明できる。

$$F = 1.16 \times (D^{1/2} / L) T^{1/2}$$

ここで F は時間Tにおける既放出のフラクション

D は膨潤したフィルム中のPDGFの拡散係数

L は膨潤したフィルムの肉厚

である。

式からF対時間の平方根は一次関数で比例することがわかる。F対時間の平方根プロットより、PDGFの放出量と時間の平方根の間には線型関係があることがわかる。

拡散係数(D)はプロットの傾き、及び式中に用いたコラー

ゲンフィルムの乾燥時の肉厚より計算できる。フィルムの肉厚を0.15mmとして計算した場合、拡散係数は $3 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{sec}$ となる。この値は、ゲル膜中におけるPDGFの拡散係数の値よりもかなり小さい。

影響したコラーゲンフィルムの測定は実測が難しいので、次の様に見掛けの拡散係数(D_a)を定義する。

$$D_a = D (L_0 / L)^2$$

ここでD及びLは先の様に定義し、かつ L_0 乾燥フィルムの肉厚である。見掛けの拡散係数(D_a)は次式によるF対時間平方根プロットの傾きより求められる。

$$F = 1.21 \times (D_a^{1/2} / L_0) T^{1/2}$$

図6に活性成分の放出速度の様々な比較検討結果を示した。この放出速度測定法を用いれば、フィルム肉厚がPDGF放出速度に及ぼす影響を調査できる。フィルムを標準条件下で生成し、同一条件下で溶媒を完全に除去したとすれば拡散係数は肉厚に依存しないはずである。先に示した三番目の式からF対 $T^{1/2}$ プロットの傾きはフィルムの肉厚値と逆比例することがうかがえる。

キャストフィルム形成法の限界を因るため、同一コラーゲ

ン溶媒より、乾燥条件を同じくして四種類のフィルムを生成した。どのフィルム膜においても、それぞれの個体は類似の肉厚に生成できた(A膜:0.071mm, B膜:1.12mm, C膜:1.16mm, D膜:1.23mm)。

予想通り、成長因子の放出速度はフィルムの厚みの増加により低下した。このデータより計算したコラーゲンフィルム中におけるPDGFの見掛けの拡散係数は、A, B, C及びD膜のフィルムで、それぞれ1.5, 1.4, 1.5, 及び1.6(全て $\times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{sec}$)であった。理論的には拡散係数はフィルムの肉厚にかかわらず同一のはずである。この結果より、流延フィルムキャスト法は少なくともフィルム肉厚が0.16mmまでは非常に信頼性の高いフィルムが得られることがわかる。

1.23mmにおける拡散係数が高い値となったのは、溶媒の蒸発が不完全であったために厚めのフィルム中に溶媒が残存していたことによるとと思われる。このことは厚いフィルムの作成には乾燥時間の延長またはより高い温度が必要であることから裏付けられる。

さらに、PDGFの初期濃度がその放出挙動に与える影響を検討するために、7種のフィルムを作成した。全てのフィルム

は近似の肉厚(約0.15mm)でPDGFの濃度のみが異なる様に作成した。7種の全てのフィルムにおいて、非常に類似した放出挙動が観察された。

さらに表2に7種のフィルムのそれぞれの見掛けの拡散係数を示す。

表 2

PDGF濃度の影響

フィルム	濃度	$D_a \times 10^{10} (\text{cm}^2/\text{sec})$
A	1 ×	1.05
B	1 ×	1.14
C	2 ×	1.61
D	5 ×	1.54
E	10 ×	1.36
F	20 ×	1.72
G	30 ×	1.62
平均	—	1.17 ± 0.21

例5: Blood-Bedicle モデルによる組織

量の測定

10個体のルイスラット(125~150g)において、左胫骨後部及び大腿部の動静脈血管束を足首部より鼠径部韧带部まで切開した。直径1.5cmの二枚のコラーゲンディスクを用いて血管束をはさみ込み、さらにその中にスプーン形状をしたシリコンゴムを入れた。15個体のラットには、256 均の組み換えBB-PDGF(PDGF二量体、米国特許出願(54,194 及び124,451 それぞれ1989年12月19日、1990年12月13日出願)を含有するコラーゲンディスク入り15個体は対照として成長因子を含まないコラーゲンディスクを用いた。対照及び実験用動物を5個体ずつ5, 10, 及び15日目に解剖した。シリコンゴムの大きさを肉眼、並びに計数比コンピューター及び組織形態測定の三次元復元によって評価し、発生組織量を決定した。

結果を表3に示した。

表 3

組織発育量 (平均 ± 標準偏差)

時間 (日)	対照	PDGF
5	11.6 ± 10.1	11.8 ± 15.0
10	15.3 ± 9.8	165.9 ± 21.4
15	17.1 ± 10.7	209.0 ± 23.5

例 6 : ウサギ耳部モデルを用いた創傷治癒測定

この例は、外科的手法によってウサギ耳部位に与えた直径 6 mm の皮膚潰瘍の治癒速度に対してコラーゲンフィルム中の成長因子が及ぼす影響を測定したものである。この切創創傷モデルによって全層皮膚創傷 (例えばヒト脚部潰瘍) に関する治癒パラメーター (例えば、わずかな創傷の収縮、肉芽新組織の発生、上皮被覆) を描写することができる。創傷の収縮による変化量を無視すれば、先の全層創傷モデルによって上皮被覆及び肉芽新組織形成の両方を組織学的に定量することができた。さらに付け加えるならば、軟骨が無血野であるが故に、軟骨膜を外科摘出した時にも、肉芽新組織及び新しい上皮が創傷周囲部より単独で成育する。この外科手術においては PDGF を投与した。

Medical Center, Division of Technical Services, St. Louis, Missouri) 上に固定した。この時、パークランプを二つ利用し、一つは先端、もう一つは耳の付け根に、血液を妨またけない様にウサギの耳を固定した。動物を滅菌した布で包み込み、術野 (ここでは、露出させた耳の内表面) に Betadine を噴き付け、3 ~ 5 分間乾燥した。

B. 創傷処理

創傷処理行程は首尾無断的手法で行なった。顕微外科機器、6 mm 冠状ノコギリ、(トレフィン)、及び両眼顕微鏡 (10×, 11x) を用いて各ウサギの耳内面を静かに切り刻み、6 mm のバイオブシー穴とした。

続いて、そのバイオブシー部位より全ての組織及び組織 (骨膜も含む) を軟骨が露出する深さまで摘出した。この時、顕微外科鉗子、鋭切りバサミ、2 mm エッジレンバート骨膜エレベーターを用い、無菌綿チップを当てがった。軟骨膜及び付加組織を解離し除去した。バイオブシー穴より軟骨を完全に切創することは実験の目的上必要ないことである。しかしながら、部分的な厚みで軟骨を切り刻むことは避けがたい。

軟骨中の全ての刻み目又は自然穴の位置を注意深く観察し記

A. 手術前準備

各個体が約 3.4 ~ 3.5 kg の若成獣ニュージーランドシロウサギ (M & K Rabbitry, Bentonfabriken, Arkansas) に対して Leupen® (Farbwerke, Bayer, West Germany) を麻酔剤として使用後 (10 分後)、ケタミン (10 mg/kg) 及びキシロカイン (5 mg/kg) の両方を筋肉内投与して麻酔をほどこした。小さな綿またはガーゼ栓を全てのウサギの両耳に入れた後、両耳の内面及び外端部をアニマルクリッパー (#10 ブレード) を用いて削った。市販の脱毛クリーム Veet® を各ウサギ耳内面に塗り、10 分後に乾燥ガーゼにて拭き取った。

耳内面を塩溶液含浸ガーゼに拭き、続いて 70% アルコール溶液で拭いた。全てのウサギの片方の耳内面皮膚組織層に 10 ゲージ針を用いて 1 : 1000 の割合で 1000 相当のエピネフリンを含有する 2% キシロカイン溶液を浸透により浸透させた。(1.5 ~ 3.0 秒が必要)。次にこの浸透部位を 3 回 Betadine によりこすり洗いし続けて 70% アルコール溶液を用いて行なった。必要ならばここで耳栓を乾燥した栓と交換した。

次にウサギを無菌外科手術室へ移し、浸透させた側の耳をプレキシガラス製 "イヤード" (Washington University

製した (評価時の対照のため)。

創傷部位が過血状態とならない様に無菌的に綿チップを当てがってバイオブシー部位より血液を除去した。各々の完成バイオブシーは小さな塩溶液含浸ガーゼにて包んだ。各々の創傷耳に四つの成熟した 6 mm 潰瘍バイオブシーが正中線 (ボード上に固定した耳を折りたたむことによって定義される) に対して両側に二つづつできた。

5 つ以上のバイオブシー部位を付けた耳は一つもなかった。それぞれのバイオブシー部位は最低でも 1 mm は離した。処理が完了した耳は塩溶液含浸ガーゼにて包みテープにて包囲し PDGF の投与まで湿潤状態を保った。次にもう一方の耳を、こすり洗いし、固定した後、先の耳と同様に創傷を付けた。各々の耳のバイオブシー部位より血液を除去し完成した各々のバイオブシー部位を小さな塩溶液含浸ガーゼで包んだ。処理が完了したもう一方の耳についても、PDGF 投与の時まで塩溶液湿潤ガーゼにて包んだ。創傷処理実験中のここまでの時点で明らかに麻酔が切れたと思われるウサギについては、15 mg/kg のケタミンを筋肉内投与し、再度麻酔をかけた。

C. 創傷への活性化因子

可溶性コラーゲンよりウェハー当りに5.1 μgのPDGFを含むコラーゲンウェハー（直径8.5cm）を作成した。

外科的調査、観察のもとでウサギを麻酔よりさました。覚せいに応じて、プラスチック性ネックカラー（Cristal Center, St. Louis, Missouri）をウサギの首まわりにウサギが創傷または被覆物を壊さないように巻いた。ここでネックカラーは広げると約15~25cmになる。ウサギは評価を行なう時まで個別のカゴに入れた。評価の時までにネックカラーがはずれてしまったウサギの創傷及び何らかの原因でTegaderm®が壊れた時の創傷については、発覚後すみやかに再評価し、創傷にダメージが見られる場合分析用母体より放棄した。

D. 結果

ウサギを解剖する際、手術前準備に記述した方法と同様に麻酔した。各々のウサギは体重を測定し記録した（各々の創傷は写真撮影した）。また創傷状態の質的説明を記録した。この時特にTegaderm®の有無、被覆材下の過度の分泌物の有無に注意した。ウサギは心臓内への3ml/1gの空気注入により空気閉塞させ落した。ナイフハンドルに#15サージカルブレードを取り

付け、このウェハーを用いてウサギの両耳を体より切断した。各々のバイオブシー（Tegaderm®）には手をつけず、約5mm周辺の組織もろとも）を耳より切断し、正中線より正確に二分するためにバイオブシー部位を測定した。ここでは、創傷処理を行なった日の記録を参照し軟骨中の自然穴または切り刻み跡を避けた。バイオブシーは片刃カミソリを用いて注意深く二分した。この時、創傷定位を破壊しない様に一回のみの振切り動作で二分した。二分したバイオブシーは即時、ウサギと同番号をラベルしたカセットに移し、10%のホルマリン緩衝液で固定し、組織学的評価へまわした。

E. 組織学的定量分析

予備実験では、組織学的分析方法によって創傷処理を行わない時より、創傷処理後3、5、7、10、及び14日まで確認した。3日目において上皮被覆は見られなかった。

10日目及び14日目では全ての創傷が全面、上皮被覆された。その結果、5日目及び7日目についてさらに分析を行なった。注意深く二分した面より5mmの位置の創傷断面を包埋、切断、ヘマトキシリン-イオシン染色した。

創傷の真中心部の断面を得るために、切断面の凹凸を最小限にした。上皮被覆面と創傷面とのギャップ（EG）、肉芽組織

の創傷端縁から高さの最大値（MH）、及び肉芽組織面の創傷面とのギャップ（GTG）を目盛り付きレンズ装着マイクロメーターにて測定し、単位をミリメートル（mm）に換算した。測定に際しては二人の個別の測定者によりスライドの番号を知らせることなく行なった。

測定終了後（スライド番号公開後）両測定者の測定値の平均を計算し、統計的に分析した。両測定者の測定値は全般的に5%範囲の相違におさまっていた。

創傷直後の創傷の組織学的分析により、EG及びGTGが、それぞれ531及び11（平均±標準偏差6個体）と得られた。これらは予想通りの値であった。ここで外科的創傷方法、創傷二分手法について確認を行ない、次の組織学的分析へ回した。新肉芽組織（NGT）の発生は創傷を負わした日のGTG値（5.31mm）より、創傷後日の測定日のGTG値より差し引いて計算した。創傷は同心円的に周縁より治癒し、収縮がないと言う仮定のもとで、おおよその新肉芽組織の面積及び体積を計算した。計算にあたっては、評価日の創傷面積（GTG値より計算した）を創傷を負わせた日の面積（22.7cm²）より差し引いて求めた。創傷を負わせた日には、創傷周辺部にインディアインクを入れ墨し、治癒中の収縮の程度を評価した。7日後、創傷

の直径に変化はなかった。感染が見られる創傷（5%未満）または乾燥した創傷（5%未満）については、測定対象より除外した。

臨床的に感染が見られなかった創傷について培養を行なったが、病原体の生育は見られなかった。

SASソフトウェアを用いて無周期変数及び周期変数統計分析を行なった結果を表4に示す。同様の実験を、PDGF含有コラーゲンウェハーを用いて行なった。MH値及び新肉芽組織の計算値を図8に示す。

表 4

	対照 コラーゲン ウェハー	PDGF-β コラーゲン ウェハー
MH	66.1 ± 8.74	74.3 ± 13.3
GTG	444 ± 51.75	450 ± 67.5
Net GTG	124.7 ± 51.52	118.5 ± 61.9
Area of Net GT (cm ²)	3.7 ± 1.62	9.2 ± 4.1
EG	87.1 ± 37.1	152.4 ± 154.5
Vol of Net GT (mm ³)	6.5 ± 2.8	7.0 ± 4.3

例7:ウサギ胃の引張モデルによる創傷治療測定

Animal Care and Use Committee 規定の倫理的承認のもとで、胃中央部線状創傷モデルを動物において実行した。2.1 ~ 3.5kg のニュージーランドシロウサギ (Doe Valley Farm, Bentonville, Arkansas) をアテロピン (0.1mg/kg) 及びアセプロマジン (0.15mg/kg) を皮下注射し、予備麻酔を行ない10分後に、ケタミン (0.15mg/kg) 及びキシラジン (5mg/kg) により麻酔した。ウサギ腹部を#18ブレードにより剃り、無菌的に外科手術の準備をした。正中線18cmにわたり開腹し、盲腸をよけ、球状嚢及び約18cmの盲腸を露出した。球状嚢より遠位にある膨起二つを選び、対とし、3cmの線状切創を盲腸の長さ方向と平行に入れ、さらに180度反対側にも入れた。最初の二切創末端端よりも遠位から、さらに二つの膨起を選び、同じ様に2~3cmの切創を入れた。再現性のある外科手術水準とするために、切創を入れるのは漿膜及び筋層に徹底し盲腸粘膜層には手をつけなかった。

次にコラーゲン細片を創傷内に粘膜筋板に対して平となる様に入れた。切創は5-0ポリプロピレン縫合糸 (Ethicon Corp., Somerville, New Jersey) により縫い合せた。この時

一センチメートル当りに5針の割合で創傷縁端より2ミリメートルの部位より縫合した。縫合糸は漿膜、筋、粘膜層を通し、各層を引き寄せ、コラーゲン細片を粘膜筋板と縫合した。最後の一针の縫合時に、対照用創傷では結び目を切り、実験用創傷においては、そのままにしておいた。このため評価時においてのあらゆるミス要因が除去できるわけである。四ヶ所の創傷において、治療実験処理とビヒクル単独処理 (対照) を注意して行なった。開腹切開部は標準的手法で縫合した。ウサギは標準飼料 (Tollard Rabbit Chow, Illinois) によって飼育し、水は随時与えた。また創傷された環境下で独居屋に入れ飼育した。予定日に、ウサギ耳端静脈よりペントバルビタール (150mg/kg) を静注し、人道的安楽死をさせた。盲腸の創傷切片を摘出し、含有物を徹底的に洗浄した。

各々の創傷より縫合糸を無血的に抜糸し、8mmと規格した細片を Punchtemplate (Washington University machine shop) を用いて3本づつ各々の切創に対して直交する様に切り取った。組織学試料は創傷細片間の部位より採取した。各々の切創より採取した3本の細片 (実験用6個体、対照6個体) において、張力計 (Tensometer 10, Monsanto, St. Louis, Missouri) を用い

て、1/2単位レベルで創傷破損強度を測定した。明らかな感染、血腫が見られる試料、または接着度が明らかに低い試料は無視した (分析対象から無視した創傷は全体の2%未満であった。)

張力計試験は電氣的鉤爪クランプを用いて10mm/minの速度で全ての創傷について行なった。これは創傷部位でのみ破損が起こる様にするためである。張力測定学解析は三つのカテゴリー (基本組織、筋組織、及び盲腸組織) に分けて行ない、各々別にデータ報告した。組織学的解析は、各母体より適合した試料について行なった。試料をマイクロカセットに縫い込み、ホルマリン中に保管し、後日ヘマトキシリン-イオシン染色した。ここで組織学的試料の肉厚、肉芽組織量、及び壊死兆候を評価し、結果を記録した。

盲腸組織における結果を図9に示す。

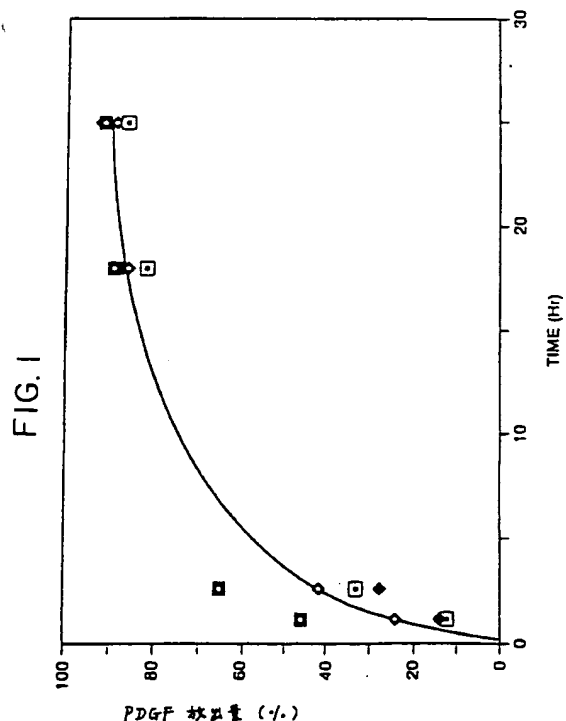


FIG. 2

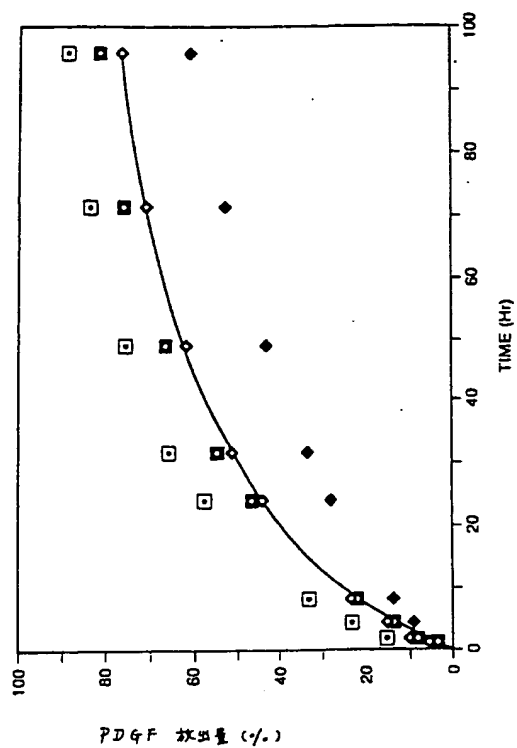


FIG. 3

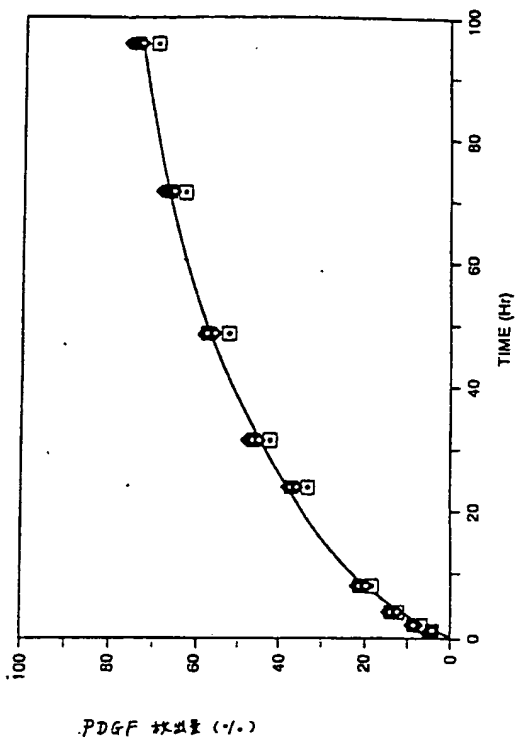


FIG. 4

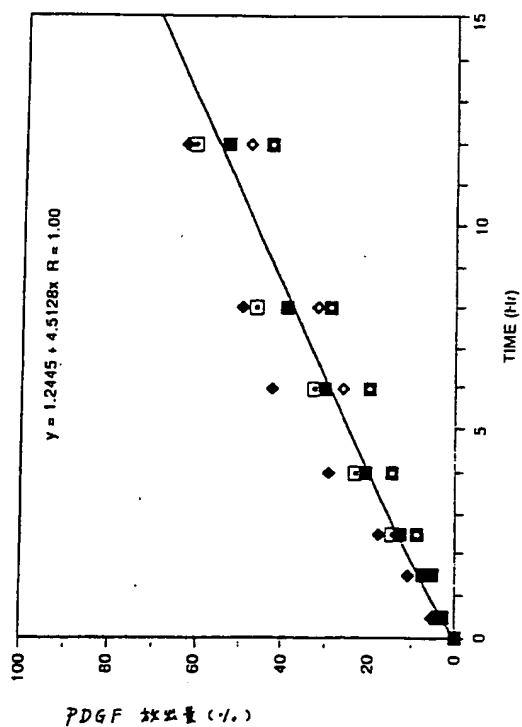
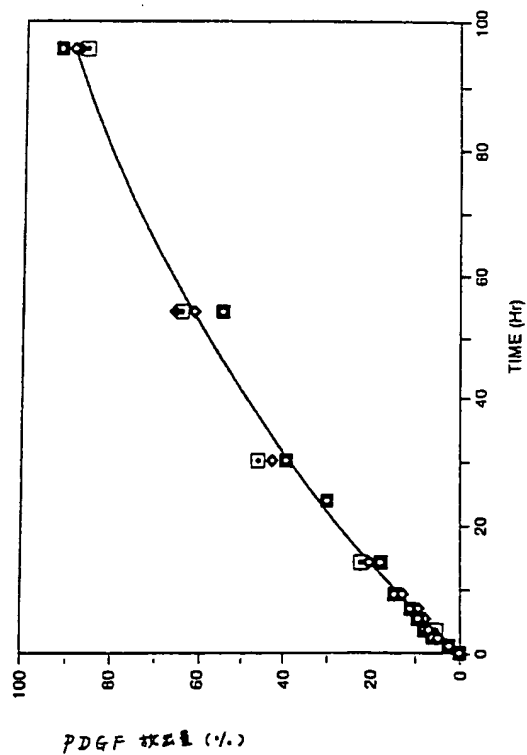
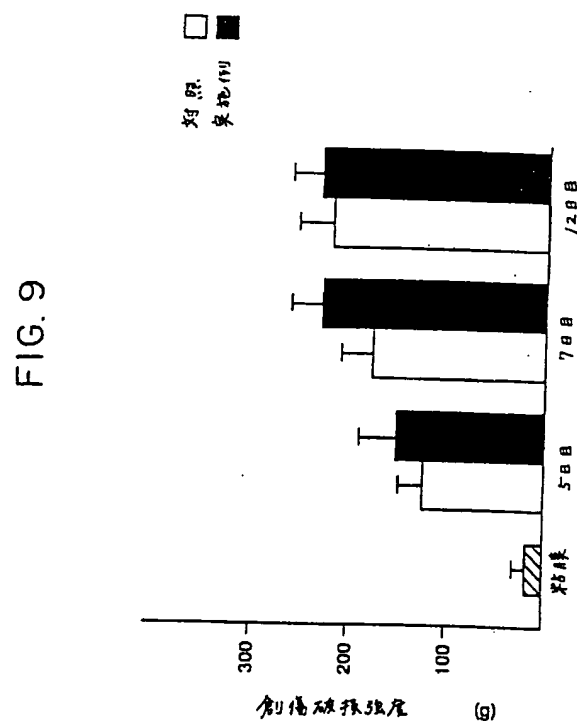
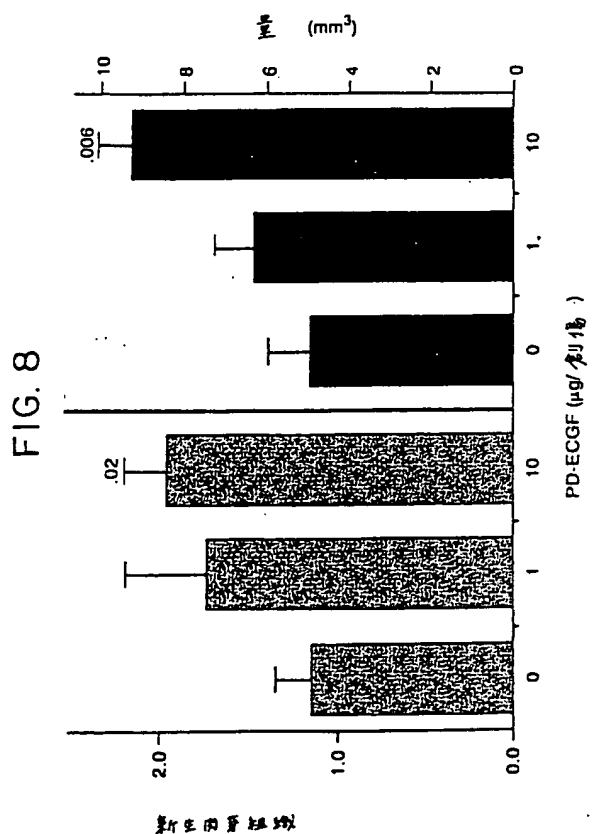
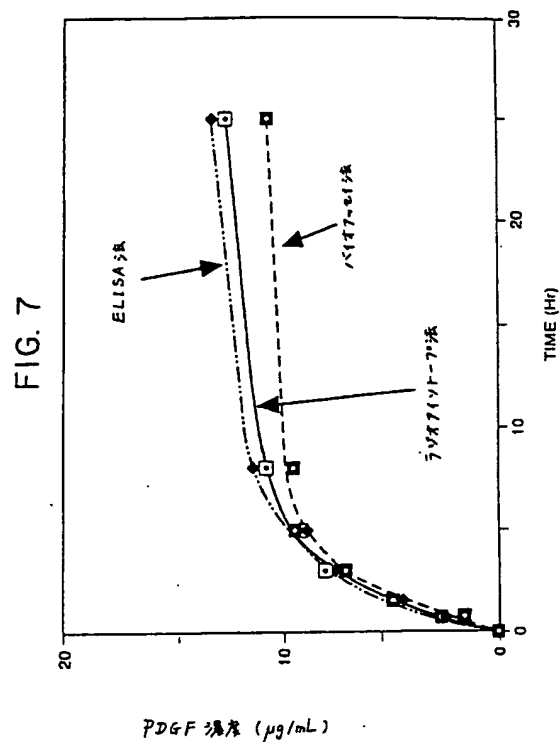
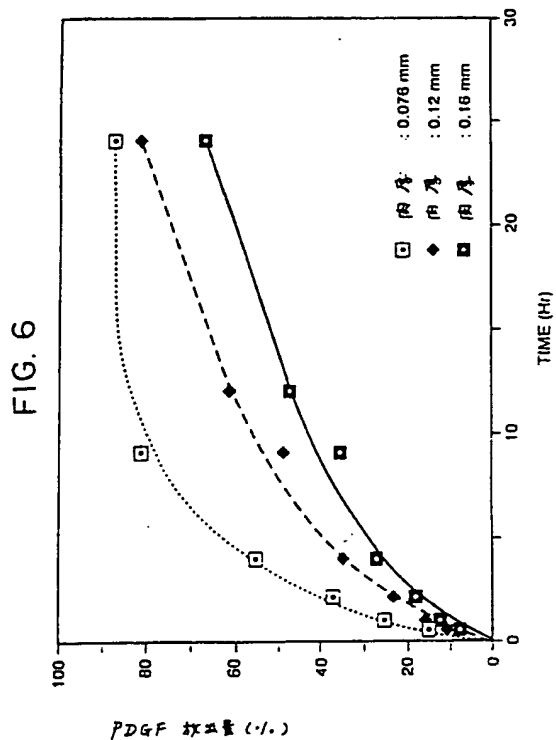


FIG. 5





CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (DDCI) JALIS 5174; AELI 1369 US CL: J48423; A2, 644; 442; 132/136; CMA219.3; 604/204 According to International Patent Classification (IPC)			
R. PATENTS SEARCHED Minimum documentation searched (Information systems followed by classification systems) U.S.: 624/423, 443, 444, 445; 128/156; 424/319.3; 604/304			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base searched during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS Search Term: collages and vessel and reservoir (S1) + L1 and growth (S4) keyword			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
Y.P	U2, A, 2,101,680 (CHVAPFL) 16 April 1972, use the abstract, the figure and columns 2 (lines 18-39) and the paragraph beginning column 2 to column 3.	1-46	
Y	U2, A, 4,909,344 (QUARPOFF) 20 March 1988, use the abstract, the figures and the examples.	1-46	
Y	U2, A, 4,908,402 (LEBOVICH) 23 February 1989, use the abstract and columns 6 (line 15) to column 9 (line 5) and the examples.	1-46	
Y	U2, A, 4,909,354 (QUARPOFF) 25 July 1988, use the abstract, the figure drawings and the examples.	1-46	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the examination of Div. C. <input type="checkbox"/> See parent family members.			
Y*	Relevant documents of other documents	Y	
A*	Documents published in the form of the art which is not considered to be part of pertinent literature	Y	
X*	Other documents published on or after the international filing date	Y	
Y*	Documents which show features or priority claims or rights to claim to establish the publication date of another citation or other relevant matters (see example)	Y	
Y*	Documents referring to or with illustrations, see addition or other items	Y	
Y*	Documents published prior to the international filing date but later than the parent date filing	Y	
Date of the actual completion of the international search: 03 AUGUST 1992			
Name and mailing address of the ISA/ Communicator of Patent and Trademarks Int. Pat. Washington, D.C. 20531			
Periodic fee: NOT APPLICABLE			
Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992			
Date of mailing of the international search report: 15 SEP 1992		Authorized officer: <i>NATHAN M. WUTTER</i> NATHAN M. WUTTER Telephone No.: (907) 258-2511	

(72) 発明者 ピアス、 グレン・エフ
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・91360、
 サウザンド・オークス、リンウッド・スト
 リート・645

(72) 発明者 ビット, コリン・ジー
アメリカ合衆国、カリフォルニア・91361、
ウエストレイク・ビレッジ、リーワード・
サークル・2379

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.